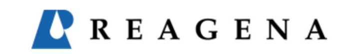
Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgG EIA	Mode d'emploi		Fabricant : **Reagena International Oy Ltd Takojantie 18, 70900 Toivala, FINLANDE www.reagena.fi, info@reagena.fi**	
REF 114302	Version 1.1 FRE			

Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgG EIA

Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgG EIA est une épreuve immunoenzymatique de détection des anticorps IgG des virus Dobrava et Hantaan dans le sérum humain. Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgG EIA est exclusivement destiné à l'usage professionnel.

Les virus Hantaan et Dobrava appartiennent au genre hantavirus et sont connus pour causer des fièvres hémorragiques à syndrome rénal (FHSR). Le virus Hantaan est présent dans la plupart des pays asiatiques alors que le virus Dobrava se trouve en Europe centrale et orientale. Les virus Hantaan et Dobrava sont transmis aux humains par inhalation ou contact direct avec des excréments de rongeurs contaminés.

PRINCIPE DU TEST

Avec le Reagena DOBRAVA-HANTAAN IgG EIA, la protéine recombinante de la nucléocapside du virus Hantaan est immobilisée sur une plaque de microtitration. L'antigène capture les anticorps spécifiques aux virus Dobrava et Hantaan présents dans l'échantillon. Les anticorps IgG capturés sont détectés par enzyme HRP et le développement de la coloration est assuré par un substrat de TMB. La durée totale d'incubation est de deux jours et demi.

CONTENU DU KIT

1 cadre EIA
3x4 bâtonnets diagnostiques (8-barrettes de microtitration)
Tampon de concentré de lavage x 2
Tampon pour dilution
Contrôle, négatif
Contrôle, positif
Conjugué HRP
Substrat TMB
Solution d'arrêt
Mode d'emploi

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON INCLUS DANS LE KIT

Pipettes de précision et embouts de pipette, 5-100 µl
Dispositif ou pipette de lavage des plaques, 250 µl / microcupule
Tubes d'échantillonnage 1 - 5 ml
Une fiole de 0,5 ou 1 L
Ruban d'étanchéité EIA
Lecteur de microplaque EIA à longueur d'onde de 450 nm
Agitateur de plaque à microcupules

CONSERVATION

Conserver le kit entre +4 et +8°C. Le kit reste stable jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette. Voir le tableau page 2 pour les informations concernant la conservation et la stabilité du kit.

ÉCHANTILLONS

Il est conseillé d'utiliser des échantillons frais (plutôt que congelés). Les échantillons congelés peuvent entraîner des faux positifs lorsque les résultats sont agrégés. Si l'échantillon est agrégé ou de mauvaise qualité, veuillez centrifuger les échantillons pendant 5 minutes à 3000 x g avant de les utiliser.

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

- Ne pas mélanger de composants issus de lots différents.
- Ne pas utiliser de bâtonnets diagnostiques si l'emballage en aluminium qui les contient est endommagé.
- Ne pas mélanger les échantillons à tester puisque différentes matrices pourraient entraîner une mauvaise reproductibilité.
- Toute infection bactérienne ou fongique des tampons ou réactifs pourra entraîner des résultats erronés. Jeter tout réactif qui aurait l'air trouble lorsque vous l'inspectez à la lumière.

AVERTISSEMENT

- Les contrôles comprennent du sérum humain testé et trouvé négatif en VIH, HTLV, hépatite B et C. Manipuler les contrôles comme des substances potentiellement infectantes.
- Jeter les contrôles, échantillons et matériels conformément aux dispositions légales vous concernant.
- La solution d'arrêt Reagena EIA contient < 1% m/V d'acide sulfurique. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.
- Le substrat TMB Reagena EIA contient du 3,3,5,5-tétraméthylbenzidine < 0,05% w/w. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.

PROCÉDURE DE TEST

Lire attentivement le mode d'emploi avant de commencer les tests. Contacter le fabricant ou votre fournisseur en cas de questions supplémentaires concernant le produit. Effectuer les tests entre +15 et +25°C. Conserver le kit au réfrigérateur (entre +4 et 8 °C) pendant les périodes d'incubation.

1. Ouvrir le kit et vérifier qu'il contienne tous les composants figurant sur l'étiquette du couvercle.
2. Diluer les échantillons à 1:201 avec le tampon de dilution (c-à-d 5 µl d'échantillon + 1000 µl de tampon de dilution).
3. Diluer le tampon de concentré de lavage à 1:10 avec de l'eau désionisée (c-à-d 50 ml de tampon de concentré de lavage + 450 ml d'eau). Bien mélanger.
4. Dissoudre le contrôle positif et le contrôle négatif avec 1,3 ml de tampon de dilution et bien mélanger.
5. Prendre le nombre requis de bâtonnets diagnostiques EIA de leur emballage en aluminium et les placer sur le cadre EIA. Si tous les bâtonnets ne sont pas utilisés, refermer immédiatement l'emballage en aluminium et conserver les bâtonnets restants entre +4 et +8°C.
6. Laver les microcupules EIA une fois avec le tampon de lavage (250 µl / cupule). Vider les microcupules et les humidifier avec du papier mouchoir.
7. Transférer en double les dilutions d'échantillons et de contrôles positif et négatif sur la plaque (100 µl / microcupule).
8. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
9. Diluer le conjugué HRP à 1:10 avec le tampon de dilution (pour un bâtonnet diagnostique : 100 µl de conjugué HRP + 900 µl de tampon de dilution) et bien mélanger.
10. Laver quatre fois les microcupules avec le tampon de lavage (250 µl/ microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
11. Transférer le conjugué de HRP dilué avec la pipette sur la plaque (100 µl / microcupule).
12. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
13. Laver cinq fois les microcupules avec le tampon de lavage (250 µl/ microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
14. Ajouter le substrat de TMB (rose) à la plaque (100 µl / microcupule).

15. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante et *à l'abri de la lumière*.
16. Ajouter la solution d'arrêt (100 µl / microcupule) et bien mélanger jusqu'à ce que la couleur change complètement (~15 secondes, 600-800 rpm; soit avec un agitateur orbital soit avec le lecteur EIA).
17. Mesurer les résultats dans les 10 minutes avec le lecteur EIA à 450 nm.

CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer les résultats comme suit : **R = (Échantillon$_A$ / Contrôle positif$_A$) x K**

R= résultat
Échantillon $_A$ = Absorbance médiane de l'échantillon

Contrôle positif $_A$ = Absorbance du contrôle positif

K = valeur dépendante du lot qui figure dans la fiche de données de contrôle comprise dans le kit. Utiliser cette valeur pour calculer les résultats finaux.

Le résultats final est obtenu comme suit : **NÉGATIF : R < 0,**
ZONE GRISE : 0, ≤ R ≤ 1,
POSITIF : R > 1,2

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un résultat **négatif** signifie que l'échantillon ne contient pas d'anticorps IgG au virus Dobrava ni au virus Hantaan. Le patient ne possède aucune immunité contre une infection par le virus Dobrava/Hantaan. Dans l'éventualité où une infection aiguë serait soupçonnée, il est conseillé de tester les anticorps IgM du virus Dobrava/Hantaan.

Lorsqu'un résultat s'avère **positif**, il indique que l'échantillon du patient contient les anticorps IgG au virus Dobrava ou Hantaan. Le patient présente alors par conséquent soit une infection par le virus Dobrava/Hantaan soit une immunité contre celui-ci. Un facteur de résistance ou d'autres infections n'entraînent pas un résultat positif de cette épreuve.

Les résultats situés en **Zone grise** signifient que le résultat ne s'avère ni positif ni négatif. Dans ce cas, suivre les consignes de votre organisation. Il faudra généralement effectuer un nouveau test sur un nouvel échantillon quelques jours plus tard.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Vérifier que l'absorbance médiane du contrôle négatif et du contrôle positif réponde aux critères figurant sur la fiche de données de contrôle. Veuillez noter que les valeurs des contrôles positifs et négatifs peuvent varier de lot à lot.

La variation d'absorbance de chaque paire échantillon/contrôle doit être inférieure à 10%. Si le contrôle positif est utilisé dans différentes positions sur la plaque, la variation d'absorbance doit être inférieure à 20 %.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité et spécificité :

La sensibilité de 99 % et la spécificité de 99 % ont été obtenues en analysant les échantillons sériques de 41 patients en comparaison à la méthode de référence (IFA et ELISA, Institut de microbiologie et d'immunologie de Ljubljana, Slovénie).

INFORMATIONS CONCERNANT LES COMPOSANTS DU KIT

Composant	Code	Information	Consignes d'utilisation	Conservation & stabilité
Bâtonnets diagnostiques	114302t	Plaque de microtitration munie d'un revêtement de protéines de la nucléocapside du virus Hantaan.	Lavez les bâtonnets avec le tampon de lavage juste avant utilisation.	Non ouvert, dans l'emballage en aluminium, entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon pour dilution	114x02v5	Tampon tris. Précoloré (rose) 65 ml.	Prêt à l'emploi	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, positif	114302v1	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, négatif	114x02v7	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon de lavage concentré	114x02v6	Tampon tris. 2 x 50 ml	Diluer à 1:10 avec de l'eau désionisée juste avant utilisation.	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Conjugué HRP	114302v2	Anticorps anti-IgG humaines conjugué à la peroxydase de raifort. 1,5 ml	Diluer à 1:10 avec le tampon de dilution juste avant utilisation.	A l'abri de la lumière et entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Substrat TMB	114x02v3	3,3',5,5'-Tétraméthyl-benzidine. Précoloré (rose). 12 ml	Prêt à l'emploi	A l'abri de la lumière et entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Solution d'arrêt	114x02v4	0,1 M d'acide sulfurique. 12 ml	Prêt à l'emploi	Entre +4 et +8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.

LITTERATURE

Hujakka H., et al. 2003 Diagnostic rapid tests for acute hantavirus infections: Specific tests for Hantaan, Dobrava and Puumala viruses versus a hantavirus combination test. J. Virol. Methods 108(1):117-122.

Hujakka H., et al. Serological rapid tests for detection of hantavirus IgM antibodies. Abstract in XIIth International Congress of Virology, Paris 27th July – 1st August, 2002.

Vapalahti O., et al. European Hantaviruses: Diagnostic aspects. Abstract in The Fifth International Conference on Hemorrahagic Fever with Renal Syndrome (HFRS), Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS), and Hantaviruses, 13-16 June 2001.

Avšič-Županc T., et al. Characterization of Dobrava Virus: a Hantavirus from Slovenia. Journal of Medical Virology 1992; 38:132-7.

Elgh F., et al. Serological Diagnosis of Hantavirus Infections by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Detection of Immunoglobulin G and M Responses to Recombinant Nucleocapsid Proteins of Five Viral Serotypes. J Clin Microbiol 1997, 35(5): 1122-30.

Klempa B., et al. 2004 First molecular identification of human Dobrava virus infection in central Europe. J Clin Microb 42(3): pp 1322-1325.

Sirola H. 2003. Serological rapid tests for detection of human and rodent hantavirus infections. Doctoral dissertation. Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 155. ISBN 951-781-253-1. ISSN 1235-0486.